

液蜡发酵制取混合二元酸的研究*

佟明友 李淑兰 方向晨

(抚顺石油化工研究院 抚顺 113001)

关键词: 热带假丝酵母, 发酵, 混合二元酸(DCA)

中图分类号: TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0114-03

长链二元酸作为重要的精细化工中间体,在化工、轻工等领域有广泛用途。它是合成大环香料、聚酯树脂、高级润滑油、高档涂料的主要原料。用化学法生产二元酸,原料来源受到限制、工艺路线长、生产成本低。利用微生物发酵生产二元酸具有工艺简单、副产物少、无污染等优点,已取代了传统的化学法。近年来,国内外关于发酵法制取长链二元酸的研究较多^[1,2];国内已有研究^[3,4,5],主要报道单一长链二元酸的发酵研究。由于混合二元酸的发酵产量偏低,产品深加工种类少,有关混合正构烷烃发酵的研究报道较少。近几年来,随着二元酸的下游产品开发,混合二元酸的用途及其合成某些精细化工产品的优势已逐步为人们所认识,由于液蜡原料来源广、价格低,混合二元酸合成的香料、服装热熔胶等产品在某些性能上优于用单一长链二元酸合成的同类产品,因此,混合二元酸的发酵研究具有重要的现实意义^[6]。本文主要报道混合二元酸高产菌株的诱变筛选和在 10L 发酵罐的产酸结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

本实验室保存的热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 突变株 FYD-2, 经过对出发菌株 *C. Tropicalis* SFP-1186 诱变筛选获得。

1.2 试剂

混合烷烃 ($nC_9 \sim nC_{16}$), 纯度 98%, 由大庆石化总厂提供。其正构烷烃组成 (v%) 为 nC_9 1.36, nC_{10} 4.60, nC_{11} 12.03, nC_{12} 33.75, nC_{13} 35.38, nC_{14} 10.95, nC_{15} 1.39, nC_{16} 0.54; 其它药品均为试剂级。

1.3 培养基

麦芽汁固体培养基为 10Brix 新鲜麦芽汁加 2% 琼脂制成斜面或平板。其它各培养基组分见表 1。

1.4 诱变筛选方法

1.4.1 紫外线照射处理: 将出发菌株接入麦芽汁斜面, 培养 2d 后接入含种子培养基的摇瓶, 振荡培养 2d。取上述种子液离心、洗涤、收集细胞, 再用生理盐水制成菌悬液。分装 10mL 菌悬液在平皿中, 置 30w 紫外灯下, 距 30cm 照射 1 ~ 4min。

1.4.2 选择初筛细胞: 将紫外线处理的菌悬液梯度稀释后涂布在麦芽汁平皿上, 与未经照射的对照平皿一起培养 2d。计算不同照射时间的致死率。挑选致死率在 70% ~ 80% 处理下的存活细胞进行初筛。

1.4.3 初筛: 将前步确定的单菌落按影印法的原理定位接入指示培养基和麦芽汁培养皿上, 培养 2d 选出在麦芽汁平皿上生长良好, 而在指示培养皿上生长较差的菌落进行复筛 (产酸对照)。

* “九五”国家重点科技攻关项目 (96-C03-03-04)

作者简介: 佟明友 (1955 -), 男, 辽宁省抚顺县人, 抚顺石油化工研究院生物工程研究室主任, 主要从事石油发酵研究。

收稿日期: 2000-12-25, 修回日期: 2001-05-18

表 1 各种培养基的组分

成分/(g/L)	指示培养基 I	指示培养基 II	种子培养基	发酵培养基
Na ₂ HPO ₄	1.0	1.0	6.0	6.0
KH ₂ PO ₄	2.0	2.0	2.0	2.0
NaCl	1.0	1.0	1.0	1.0
MgSO ₄	0.5	0.5	1.0~3.0	1.0~3.0
蔗糖			20.0	20.0
玉米浆			1.0	1.0
酵母膏	0.5	0.5	1.0	1.0
尿素	1.0	1.0	2.0~4.0	2.0~4.0
维生素 B ₁	0.1	0.1	0.1	0.1
混合烷烃	50mL		50mL	150~250mL
混合二元酸		8.0		
琼脂	20.0	20.0		

1.4.4 复筛:对前步挑选出的单菌落扩大培养后接入发酵培养基进行产酸对比。在挡板摇瓶中发酵 5d,每 24h 上调一次 pH。发酵终了,测产酸量。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体浓度:采用浊度法测定。

1.5.2 溶解氧(DO)含量:用瑞士 METTLER TOLEDO 溶氧电极检测。

1.5.3 二元酸含量:取一定量发酵液,除菌体后用 H₂SO₄ 酸化至 pH=3,加热至 95℃,冷却过滤,水洗至中性。乙醇滴定,按混合二元酸的平均分子量计算产酸量。混合二元酸组分分布用气相色谱分析。

2 结果和讨论

2.1 高产菌株 FYD-2 的诱变筛选

2.1.1 初筛细胞的选择:微生物育种的经验表明,诱变处理致死率在 80%左右时,存活细胞更容易积累正突变。本试验首先探索了最佳照射时间。在恒定距离内,照射时间与致死率成正比。在 1~4min 内选择 6 个照射时间,结果见表 2。照射 3min 的致死率为 82%,因此,选择此时间照射的存活细胞进行初筛得到正突变的概率大。

表 2 紫外线照射时间与致死率的关系

照射时间/min	1.0	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
致死率/%	38	49	71	82	90	>95

2.1.2 摇瓶产酸实验:将初筛得到的 6 个单菌落经同培养后接入 500mL 挡板摇瓶,装 45mL 发酵培养基,在 150r/min 旋转摇床上培养 5d,产酸情况见表 3。选出的 6 个单株与对照相比,正负突变都有,其中 FYD-2 的产酸量比对照提高了 21.4%。

2.2 突变株 FYD-2 的 10L 罐发酵实验

在 10L 全自动搅拌发酵罐对突变菌株 FYD-2 进行产酸评价。混合烷烃投入量 25%,种子在 20h 内生长迅速,此时控制在低 pH 条件下,20h 后转入发酵,将 pH 调至 7.0~8.0,发酵 5d,产酸 156g/L,发酵过程曲线见图 1。在 20h 之内,种子呈指数增长,但混合二元酸积累很少,因为此时控制在偏酸的条件

表 3 初筛得到的单菌落产酸情况

菌株编号	对照	FYD-2	FYD-3	FYD-5	UV-2	UV-3	UV-4
产酸量/(g/L)	67.9	82.4	68.0	70.8	66.2	62.5	73.6

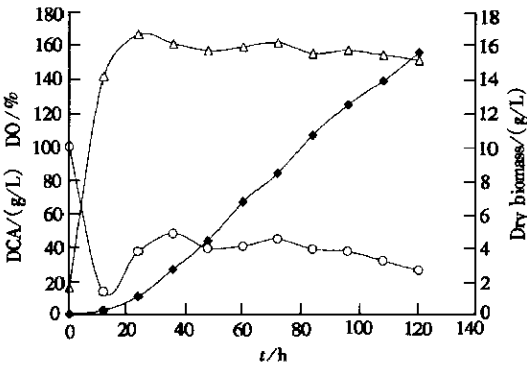


图 1 突变株 FYD-2 的生长和混合二元酸产酸的结果
—◆—DCA;—○—DO 值;—△—Dry Biomass.

不利于产酸,但却是酵母菌生长的最佳条件。因此,此阶段溶解氧百分数快速降低至低谷,说明菌体代谢旺盛,需要大量溶解在培养基中的氧,进入产酸期以后,菌体浓度和溶解氧都相对稳定,只是随着向发酵体系中补加烷烃而出现波动。产酸曲线稳步上升,以 1.5g/(L·h)左右的速率增长。说明当菌浓足够大之后,在偏碱性条件下,细胞膜的通透性发生了改变,加速了烃的摄入和产物的输出。

摇瓶产酸对比和 10L 罐发酵实验表明:突变菌株 *C. tropicalis* FYD-2 是一株发酵液蜡生产混合二元酸的高产菌株,已经传代十余次,性状稳定,适用于混合二元酸的生产。

参 考 文 献

[1] 植村南海男. 化学工业,1987,20:13 ~ 16.
[2] Stephen P, Tracy R, Kristine D, et al. Bio/Technology, 1992, 10: 894 ~ 898.
[3] 高忠翔,刘祖同. 清华大学学报,1990,30(3): 86 ~ 92.
[4] 陈远童,庞月川,郝秀珍. 微生物学报,1999,39(3): 279 ~ 280.
[5] 任 刚,陈远童. 微生物学报,2000,40(2): 214 ~ 216.
[6] 中国科学院微生物研究所经代谢组及所发酵车间. 微生物学报,1980,20(1): 88 ~ 93.

Study on Fermentation of n-Paraffin for Producing Mixed Dicarboxylic Acids

Tong Mingyou Li Shulan Fang Xiangchen

(Fushun Research Institute of Petroleum and Petro-chemicals, Fushun 113001, China)

Abstract: A mutant of *Candida tropicalis* FYD-2 was obtained from its parental strain SFP-1186 by ultraviolet treatments. On shaking flask, the yield of mixed dicarboxylic acid(DCA) by the mutant was 21.4% higher than that by its ancestor. The amount of mixed DCA reached 156g/L for 120h incubation in a 10 L autocontrolled fermentor where the culture medium contained 25 % n-paraffin. The process of induced and screening mutant was introduced and the time course of fermentation in 10 L fermentor was discussed.

Key words: *Candida tropicalis*, Fermentation, Mixed dicarboxylic acid

* Supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (96-C03-03-04)